云南植物研究 2007, 29 (2): 251～255
Acta Botanica Yunnanica

新疆沙冬青抗冻蛋白的提取分离及其热滞活性测定*

尉姗姗, 尹林克**, 牟书勇, 鲁春芳, 赵峰侠
(中国科学院新疆生态与地理研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 抗冻蛋白被发现于低温环境下生存的生物体中, 它能够吸附在冰晶表面并改变冰晶的生长形态, 对于增加植物的抗低温胁迫能力有重要作用。用纤维素 DE-52 离子柱层析提取分离出了冬季新疆沙冬青 (*Ammopiptanthus nanus*) 叶片中的抗冻蛋白 (AFPs)。差示扫描量热法 (DSC) 测定结果表明, 当蛋白浓度为 20 mg ml 时, 抗冻蛋白的热滞活性 (THA) 为 0.46℃。经 SDS-PAGE 电泳分析, 此抗冻蛋白的分子量为 119.24 kDa。

关键词: 新疆沙冬青; 抗冻蛋白; 差示扫描量热法; 热滞活性
中图分类号: Q 945 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700 (2007) 02-251-05

Extraction, Separation and Measuration of the Thermal Hysteresis Activity of Antifreeze Proteins from *Ammopiptanthus nanus* (Leguminosae)

YU Shan-Shan, YIN Lin-Ke**, MU Shu-Yong, LU Chun-Fang, ZHAO Feng-Xia
(*Xinjiang Institute of Ecology and Geography*, *Chinese Academy of Sciences*, Urumqi 830011, China)

Abstract: Antifreeze proteins (AFPs), because of their ability of adsorbing onto the surface of ice crystals and modifying their growth, have been found in many different organisms that are exposed to chilling and freezing temperatures. It is very important to increase the resisting and coercing ability at low temperature. DE-52 ion-exchange cellulose was used to extract and separate the antifreeze proteins from *Ammopiptanthus nanus* leaves. Differential scanning calorimetry (DSC) was used to measure the thermal hysteresis activity (THA). The results reveal that when the concentration of the protein is 20 mg ml, the THA of the AFPs is 0.46℃. Its molecular weight is about 119.24 kDa by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Key words: *Ammopiptanthus nanus*; Antifreeze proteins; DSC; Thermal hysteresis activity

抗冻蛋白 (antifreeze proteins, AFPs) 是生物在适应低温过程中产生的抗寒功能蛋白之一, 它能够非依数性地降低水溶液的冰点, 但对熔点的影响甚微, 从而导致水溶液的熔点和冰点之间出现差值, 这种差值称为热滞活性 (thermal hysteresis activity, THA)。它具有 3 个基本特征: 热滞效应、修饰冰晶形态效应、抑制重结晶效应。抗冻蛋白的这些特性吸引了很多科学工作者的注意, 自 20 世纪 60 年代被发现以来, 至今在鱼类、昆虫、真菌、细菌和植物中均发现有 AFPs 存在 (Sidebottom and Worrall, 2000; Craham 等, 1997; Duman and Olsen, 1993; Griffith 等, 1992; Urrutia 等, 1992; Devries and Wohlschlag, 1969)。

新疆沙冬青 (*Ammopiptanthus nanus*) 为豆科沙

---

* 基金项目: 重大基础研究前期研究专项 (2004CCA03400); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (200421106); 新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题 (XJDX0201-2005-09)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: yinlk@ms.xjb.ac.cn; 电话: 0991-7885391

收稿日期: 2006-06-20, 2006-12-01 接受发表

作者简介: 尉姗姗 (1982-) 女, 汉, 硕士研究生, 主要从事植物生理与分子生物学研究。

冬青属（*Ammopiptanthus*）植物。本属仅 2 种，起源于古热带地区，为古地中海的孑遗种，也是温带荒漠区现代分布仅有的常绿阔叶灌木（刘媖心，1982）。在长期的演化过程中，适应了不断旱化、寒化的生境。新疆沙冬青垂直分布范围在 1 800～2 700 m（潘伯荣等，1992），自然分布区极端低温可达零下 29.3℃。它具有一定的抗寒结构（周宜君等，2001），叶肉细胞中也具有一种高密度的内含物（韩善华等，1994），能够使沙冬青在这种低温气候条件下正常越冬且保持常绿。

费云标等（2000）已经分离纯化出了同属中的另一种植物蒙古沙冬青（*Ammopiptanthus monglicus*）冬季叶片中的抗冻蛋白，并测定了热滞活性：当抗冻蛋白浓度为 20 mg/mL 时，THA 为 0.9℃。新疆沙冬青作为同一属内的近缘种植物，是否也具有类似的抗冻生物活性物质——抗冻蛋白，目前尚无相关研究报道。探讨新疆沙冬青在低温胁迫条件下能否产生具有热滞活性的抗冻蛋白，对于进一步认识新疆沙冬青的进化与适应机制具有重要理论意义。

1　材料与方法

1.1　材料

所用的新疆沙冬青（*Ammopiptanthus nanus*）叶片材料于 2004 年 12 月采自于中国科学院吐鲁番沙漠植物园内的 10 年生植株。原植物产地为新疆乌恰县。从 3～5 株样株的顶部、中部和下部随机采集叶片并混匀，用液氮冷藏运回，保存于零下 80℃备用。

1.2　方法

1.2.1　样品的处理　将 100 g 新疆沙冬青叶片配合液氮用搅拌机打磨至粉状，加入 3 倍体积 pH 8.6 的缓冲液（12 mmol/L Tris-HCl，0.1 mol/L NaCl，0.1 mmol/L EDTA，1 mmol/L PMSF）混匀，于 4℃，25 000 r/min，离心 30 min，取上清液，超滤脱脂。

1.2.2　蛋白质组分的分离　采用美国 Bio-Rad 公司的双流速层析系统，将脱脂后的样品用 DE-52 离子交换柱进行层析分离。上柱前用 pH 8.6 的缓冲液（10 mmol/L Tric-HCl，100 mmol/L NaCl，0.1 mmol/L EDTA）平衡柱子，以 0.6 ml/min 的流速上样，然后用 pH 8.6，50 mmol/L Tris-HCl，50 mmol/L Tris，2 mol/L NaCl 进行梯度洗脱。NaCl 的梯度洗脱浓度依次为：0%～10%，10%，10%～30%，30%，30%～60%，60%，100%。收集各洗脱峰，脱盐后冷冻干燥。

1.2.3　热滞活性的测定　用差示扫描量热法（DSC）测定样品的热滞活性，所用仪器为美国 TA 公司生产的 Q100 差示扫描量热仪，分析软件采用仪器专用分析软件 Universal Analysis 2000。

取 20 mg/mL 的沙冬青蛋白样品 5 μL 注入铝样品盘，以空盘作为参比。先以 1℃/min 的速率使样品由室温降至 -20℃，平衡 15 min，样品结冰固化，再以 1℃/min 的速率升温至 10℃，从样品熔融峰上得到样品的熔点 T_m 和熔融焓 ΔH_m。然后以 1℃/min 的速率从 10℃降温至 -20℃，平衡 15 min，再以 1℃/min 的速率升温至 T_h（样品熔融峰所涵盖温度区间的某一温度），平衡 15 min，使样品处于部分熔融状态，再以 1℃/min 的速率降温至 -20℃，得到融化部分再次冻结时的起始温度 T_0 和焓 ΔH_f。改变 T_h，重复实验。用牛血清白蛋白（BSA）和双蒸水（ddH_2O）作对照。

1.2.4　抗冻蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析　用 SDS-PAGE 电泳（中国科学院上海药物研究所，1983）分析经热滞活性测定后具有热滞活性的蛋白质组分，分离胶浓度为 10%，采用北京赛百盛基因技术有限公司的标准蛋白质 PRO-STAIN™ Marker Ⅰ 作标准，测定蛋白质的分子量。

2　结果与分析

2.1　DE-52 分离各个蛋白质组分

经 DE-52 离子交换柱层析，收集得到 18 个洗脱峰（图 1）。以水为空白，牛血清白蛋白为对照，考马斯亮蓝染色，用紫外 - 可见分光光度计（DU800 Beckman coulter）进行全波长扫描，得知所有洗脱峰中有 5 个洗脱峰为非蛋白峰（峰 1、2、3、4、18），从而初步分离出了新疆沙冬青叶片中的各个蛋白质组分。

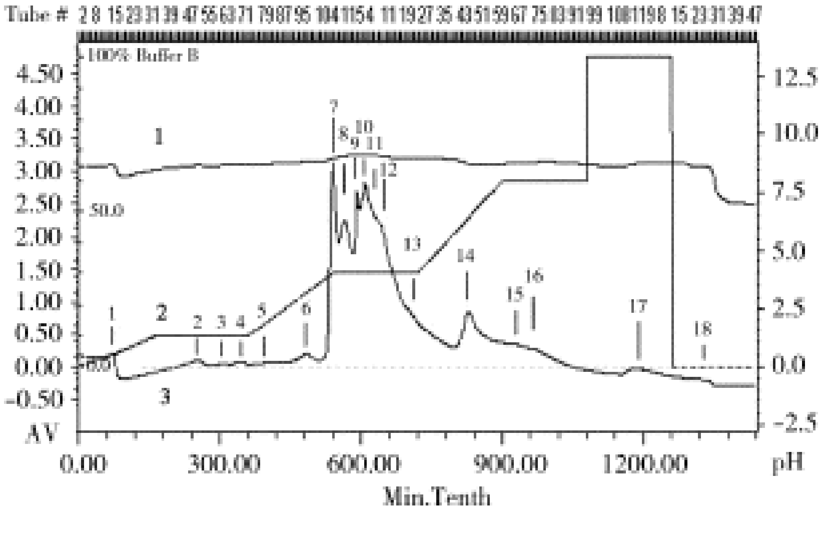

图 1　DE-52 离子交换柱层析

1．pH 变化；2．NaCl 浓度变化；3．蛋白分离

Fig．1　DE-52 ion-exchange chromatography of antifreeze proteins

1．the change of pH；2．the change of NaCl%；

3．the separation of the proteins

2.2　ddH_2O、BSA、AFP 的冻结—融化曲线

图2给出了 ddH_2O、BSA 溶液和 AFP 溶液冻结—融化过程的热流—温度曲线，并出现过冷冻结峰。它们的熔点 T_m 和熔融焓 ΔH_m 值见表1。

2.3　ddH_2O 的 DSC 热流曲线

取5 mg 的 ddH_2O 作为抗冻蛋白溶液的对照进行 DSC 实验。当停留温度（T_h）取值分别为：-1.26℃，-1.22℃，-1.2℃，-1.17℃，-1.14℃时，融化部分又再次冻结的热流-温度曲线见图3（A）。

由图3（A）可见，随着 T_h 的升高，再次冻结峰的面积逐渐增大，即部分熔融体系中融化量逐渐增大，则冰晶核的含量逐渐减少。随着降温，已融化部分立即重新结冰，放热峰曲线平滑，没有冻结滞后的现象，可见双蒸水没有热滞效应。

2.4　BSA 的 DSC 热流曲线

取5 mg 20 mg/mL 的 BSA 溶液作为抗冻蛋白溶液的对照进行 DSC 实验。当停留温度（T_h）取值分别为：-1.61℃，-1.52℃，-1.42℃，-1.34℃，-1.28℃，-1.22℃时，融化部分又再次冻结的热流-温度曲线见图3（B）。

表1　ddH_2O、BSA 和 AFPs 的熔点（T_m）和熔融焓（ΔH_m）

Table 1　The melting temperature and melting enthalpy of ddH_2O, BSA and AFPs

样品 Sample (mg)	双蒸水 ddH_2O	牛血清白蛋白 BSA	抗冻蛋白 AFPs
熔点 T_m（℃）	-1.18	-1.42	-3.84
熔融焓 ΔH_m（J/g）	289.7	261.2	224.1

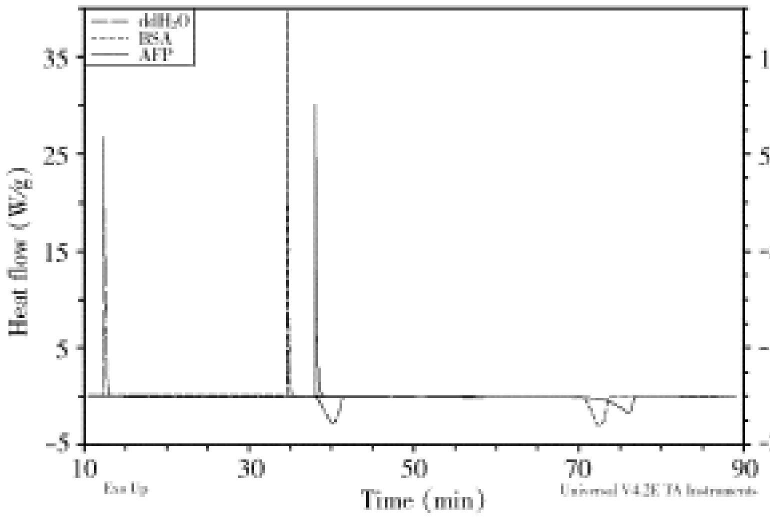

图2　ddH_2O、BSA 溶液和 AFP 溶液的冻结—融化曲线

Fig. 2　The curve of the freezing and melting of ddH_2O, BSA solution and AFP solution

由图3（B）可见，随着 T_h 的升高，再次冻结峰的面积逐渐增大，即部分熔融体系中融化量

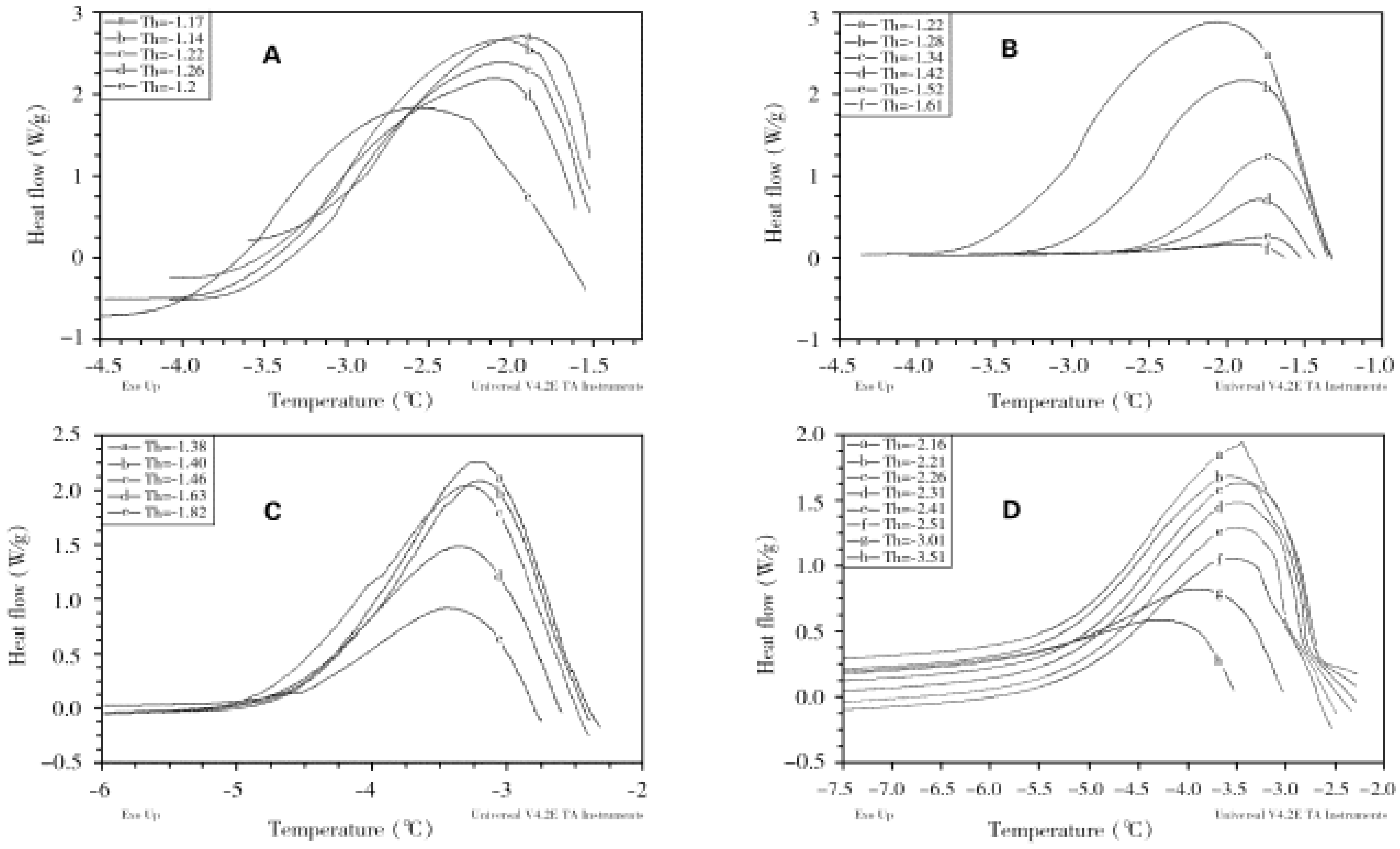

图3　DSC 热流曲线

A. ddH_2O 的 DSC 曲线；B. BSA 的 DSC 曲线；C. 无抗冻活性的蛋白组分的 DSC 曲线；D. 新疆沙冬青 AFP 的 DSC 曲线

Fig. 3　DSC curve　A. DSC curve of ddH_2O devoid of AFP; B. DSC curve of BSA solution devoid of AFP; C. DSC curve of protein solution devoid of AFP; D. DSC curve of the AFP isolated from *Ammopiptanthus nanus*

逐渐增大，则冰晶核的含量逐渐减少。随着降温，已融化部分立即重新结冰，放热峰曲线平滑，没有冻结滞后的现象，可见BSA也没有热滞效应。

2.5 无抗冻活性的蛋白组分的DSC热流曲线

层析分离出的一些蛋白组分的DSC热流曲线与双蒸水和BSA的DSC曲线相似，随着T_h的升高，再次冻结峰的面积逐渐增大，冰晶核的含量逐渐减少。随着降温，已融化部分立即重新结冰，放热峰曲线平滑，没有冻结滞后的现象，因此这些蛋白没有热滞效应，不具抗冻活性（图3（C））。

2.6 新疆沙冬青抗冻蛋白的DSC热流曲线

层析分离出的其中一组蛋白组分的停留温度（T_h）取值分别为：-3.51℃，-3.01℃，-2.51℃，-2.41℃，-2.31℃，-2.26℃，-2.21℃，-2.16℃时，融化部分又再次冻结的热流—温度曲线见图3（D）。

这一组分与其他组分明显不同。随着Th的升高，部分熔融体系中融化量逐渐增大，则冰晶核的含量逐渐减少。随着降温，已融化部分再次结冰，当T_h = -3.01℃时，放热峰曲线平滑，此时体系中冰核含量仍然较多，当T_h升至-2.31℃，-2.26℃，-2.21℃，-2.16℃时，放热峰曲线不再平滑，而是逐渐出现冻结滞后的现象，可见，该蛋白组分中含有表现热滞活性的抗冻蛋白。此时体系中冰核含量较少（≤5%），THA也随着冰核含量的减少而逐渐增大，THA与冰核含量呈现出了一定的函数关系（表2）。说明只有当体系内冰晶核含量较少时，AFPs才能起到抑制冰晶生长的作用。

表2 AFPs溶液的停留温度（T_h）、再次冻结起始温度（T_0）、冰核含量（Nuclei）和热滞活性（THA）

Table 2 The hold temperature（T_h）、onset temperature（T_0）、percent ice nuclei and THA of AFPs solution

停留温度 T_h（℃）	再次冻结起始温度 T_0（℃）	热滞活性 THA（℃）	冰核含量 Nuclei（%）
-4.51	-4.55	0.04	85.71
-4.01	-4.04	0.03	79.49
-3.51	-3.55	0.04	71.12
-3.01	-3.05	0.04	58.3
-2.51	-2.68	0.17	31.06
-2.46	-2.75	0.29	16.64
-2.41	-2.76	0.35	12.54
-2.36	-2.72	0.36	8.7
-2.31	-2.67	0.36	5.09
-2.26	-2.68	0.42	2.41
-2.21	-2.62	0.41	0.85
-2.16	-2.62	0.46	0.36

2.7 SDS-PAGE测定抗冻蛋白分子量

用SDS-PAGE检测经热滞活性测定后具有抗冻活性的蛋白质组分，考马斯亮蓝染色显示表明，具有抗冻活性的该组蛋白组成成分单一，分子量约为119.24 kDa（图4）。

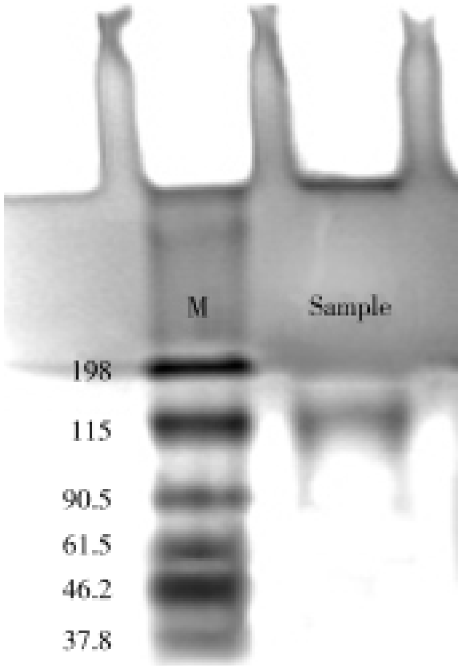

图4 具有抗冻活性的蛋白组分的SDS-PAGE电泳考染图谱

M．标准蛋白；样品．具有热滞活性的蛋白质

Fig．4 SDS-PAGE of AFP from *Ammopiptanthus nanus*

M：PRO-STAIN™ Marker Ⅰ；Sample：the AFP from *Ammopiptanthus nanus*

3 讨论

低温可以引起植物细胞出现结冰的现象，从而破坏细胞结构。有研究认为，抗冻蛋白是一种复杂而高效的生物活性物质，能够降低溶液的冰点，降低冰晶的形成速率，使结冰伤害降低到最小程度（费云标等，1992），保护细胞结构。新疆沙冬青在零下29.3℃的条件下，仍然能正常越冬保持常绿。鉴于前人对植物抗冻蛋白的研究（Deborah等，2005；费云标等，2000；Huang等，1995；Griffith等，1992），我们推断，新疆沙冬青也应该具有类似的抗冻活性物质。

热滞活性是判断抗冻蛋白的重要指标，抗冻蛋白的活性取决于热滞活性的大小（魏令波等，1999）。通过测定冬季分离出的新疆沙冬青叶片蛋白组分，结果表明，当蛋白浓度为20 mg/mL时，其热滞活性（THA）为0.46℃。此时冰晶核含量仅有0.36%，表明这组蛋白对植物细胞中冰晶的生长起到了一定的抑制作用，降低了植物的冰点，使新疆沙冬青在严冬季节免遭冰晶的伤害，起到了抗冻保护作用。因此判断，此洗脱峰

中的蛋白组分是 AFPs。经 SDS-PAGE 电泳纯度检测，该 AFP 组分单一，其分子量为 119.24 kDa。

经比较发现，本研究中的新疆沙冬青叶片抗冻蛋白的热滞活性远远低于鱼（0.5～1.5℃）和昆虫（3～6℃）（卢存福等，1998）抗冻蛋白的热滞活性，与同一属的蒙古沙冬青（抗冻蛋白蛋白浓度20 mg/mL时，THA 为 0.9℃）（魏令波等，1999）相比，热滞活性也较低。分析可能的原因有两点：其一，植物在迁地保护的过程中，由于生境的变化和有意识或无意识的人工选择，在表型、抗性和生活史等方面会发生可以遗传的改变（康明等，2005）。本次研究材料取自吐鲁番沙漠植物园长时间迁地保护条件下（海拔 -95～-76 m，冬季平均最低气温零下 9.5℃，极端低温零下 28℃）的新疆沙冬青，蛋白在表达过程中其抗冻蛋白的某些特性可能发生了变化，导致了热滞值的相对偏低；其二，在第三纪早期，沙冬青分布于古地中海沿岸，是第三纪的古热带气候条件下孕育发展起来的喜温嗜湿类群，经历了地质历史的变迁和伴随而来的气候由潮湿温热到现在的干旱寒冷，不仅从形态上发生适应性的演化，其遗传特性方面也随之相适应，在长期的演化中获得了抗旱抗寒的特性（刘果厚，1998；刘玉红等，1996）。本次测定的新疆沙冬青抗冻蛋白的热滞活性低于蒙古沙冬青，说明新疆沙冬青的抗冻性比蒙古沙冬青弱，在进化过程中蒙古沙冬青更具有对低温逆境的适应能力。因而低的 THA 表明了新疆沙冬青相对的原始性。这一点与前人对两种沙冬青的核型及酯酶同工酶的研究结果相吻合（魏岩和石庆华，1995；刘玉红等，1996）。

〔参　考　文　献〕

刘媖心，1982．我国荒漠植物区系形成的探讨［J］．植物分类学报，**20**：131—141

中国科学院上海药物研究所，1983．中草药有效成分提取与分离［M］．上海：科学技术出版社，168—189

Deborah J . Simpson, Maggie Smallwood, Sarah Twigg *et al* . 2005 . Purification and characterisation of an antifreeze protein from Forsythia suspense ［J］. *Cryobiology*, **51**: 230—234

Devries AL, Wohlschlag DE, 1969 . Freezing resistance in some Antarctic fishes ［J］. *Science*, **163**: 1073—1075

Duman TG, Olsen MT, 1993 . Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi and phylogenetically diverse plant ［J］. *Cryobiology*, **30**: 322—328

Fei YB（费云标）, Yan SY（严绍颐）, 1992 . Mechanism on biochemistry and antifreeze of antifreeze proteins ［J］. *Prog Biotech*（生物工程进展）, **12**（6）: 18—20

Fei YB（费云标）, Wei LB（魏令波）, Gao SQ（高素琴）*et al* . 2000 . Separation, purification and characterization of antifreeze proteins from *Ammopiptanthus mongolicus* ［J］. *Chin Sci Bull*（科学通报）, **45**（20）: 2185—2189

Graham LA, Liou YC, Walker VK *et al* . 1997 . Hyperactive antifreeze protein from beetles ［J］. *Nature*, **388**: 727—728

Griffith M, Paul Ala, Daniel *et al* . 1992 . Antifreeze proteins produced endogenously in winter rye leaves ［J］. *Plant Physiol*, **100**（2）: 593—596

Han SH（韩善华）, Wang S（王双）, Li Q（李琪）, 1994 . Development of specific inclusion in the mesophyll cells of *Ammopiptanthus mongolicus* ［J］. *Acta Bot Sin*（植物学报）, **36**（11）: 855—859

Huang T, Duman AG, 1995 . Purification and characterization of thermal hysteresis protein from cold-acclimated kale, Brasica oleracea ［J］. *Cryobiology*, **32**: 577—581

Kang M（康明）, Ye QG（叶其刚）, Huang HW（黄宏文）, 2005 . Genetic risks in plant ex situ conservation ［J］. *Hereditas*（遗传）, **27**（1）: 160—166

Liu GH（刘果厚）, 1998 . Study on the endangered reasons of *Ammopiptanthus mongolicus* in the desert of Alashan ［J］. *Bull Bot Res*（植物研究）, **18**（3）: 341—345

Liu YH（刘玉红）, Wang SM（王善敏）, Wang HS（王荷生）, 1996 . A study on the chromosomal geography of *Ammopiptanthus* genus ［J］. *Geograph Res*（地理研究）, **15**（4）: 40—46

Lu CF（卢存福）, Wang H（王红）, Jian LC（简令成）*et al* . 1998 . Progress in study of plant antifreeze proteins ［J］. *Prog Biochen Biophys*（生物化学与生物物理进展）, **25**（3）: 210—216

Pan BR（潘伯荣）, Yu QL（余其力）, Yan CH（严成）, 1992 . Study for the ecological environment and vulnerable reasons of the *Ammopiptanthus nanus* ［J］. *Acta Phytoecol Et Georotan Sin*（植物生态学与地植物学学报）, **16**（3）: 276—282

Sidebottom C, Worrall D, 2000 . Heat-stable antifreeze protein from grass ［J］. *Nature*, **406**: 256—263

Urrutia ME, Duman JG, Knight CA, 1992 . Plant thermal hysteresis proteins ［J］. *Biochim Biophy Acta*, **1121**（1）: 199—206

Wei LB（魏令波）, Jiang Y（江勇）, Shu NH（舒念红）*et al* . 1999 . Biological characterization of heat-stable antifreeze proteins from leaves of *Ammopiptanthus mongolicus* ［J］. *Acta Bot Sin*（植物学报）, **41**（8）: 837—841

Wei Y（魏岩）, Shi QH（石庆华）, 1995 . A analysis of *Ammopiptanthus* esterase isoyme ［J］. *Arid Zone Res*（干旱区研究）, **12**（1）: 53—54

Zhou YJ（周宜君）, Liu CL（刘春兰）, Feng JC（冯金朝）*et al* . 2001 . Advances of drought-resistance and frigid-resistance mechanism research on *Ammopiptanthus mongolicus* ［J］. *J Desert Res*（中国沙漠）, **21**（3）: 312—316